



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE**

RAFAELA ALVES DE OLIVEIRA

**PRESENÇA DE RADIORRESISTÊNCIA NA ESPÉCIE INVASORA
ZAPRIONUS INDIANUS (INSECTA, DIPTERA)**

**VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
FEVEREIRO, 2020**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

RAFAELA ALVES DE OLIVEIRA

PRESENÇA DE RADIORRESISTÊNCIA NA ESPÉCIE INVASORA
***ZAPRIONUS INDIANUS* (INSECTA, DIPTERA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Área de Concentração: Biologia da Conservação

ORIENTADORA: DRA. CLAUDIA ROHDE

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
FEVEREIRO, 2020

Biblioteca Setorial do CAV.
Bibliotecária Jaciane Freire Santana, CRB4-2018

O48p Oliveira, Rafaela Alves de.
Presença de radiorresistência na espécie invasora *Zaprionus indianus*
(insecta, diptera) / Rafaela Alves de Oliveira. - Vitória de Santo Antão, 2019.
41 folhas; il.: color.

Orientadora: Claudia Rohde.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, CAV,
Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, 2019.
Inclui referências.

1. Radiação natural. 2. Radiobiologia. Fungos. 3. Drosophilas. I. Rohde,
Claudia (Orientadora). II. Título.

571.45 CDD (23.ed.)

BIBCAV/UFPE-18/2019

RAFAELA ALVES DE OLIVEIRA

**PRESENÇA DE RADIORRESISTÊNCIA NA ESPÉCIE INVASORA *ZAPRIONUS
INDIANUS* (INSECTA, DIPTERA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente.

Aprovado em: 20/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Eduardo Garcia (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Geórgia Fernanda Oliveira (Examinada Externa)
Secretaria de Educação – GRE Vale do Capibaribe, Pernambuco

Prof. Dr. Ronaldo Celerino da Silva (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Aos meus pais Severino Batista de Oliveira e Helena Maria de Oliveira, à minha irmã Ravana Alves de Oliveira, à minha filha Maria Luísa de Oliveira Ferreira, ao meu marido Luiz Alberto do Nascimento Filho. Dedico a vocês esse fruto do nosso esforço. Graças a vocês isso foi possível!

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que me concedeu a oportunidade de poder continuar a minha jornada acadêmica, por me dar saúde para poder desenvolver o meu trabalho e ter me dado forças para ir em busca de realizar meus sonhos.

Agradeço imensamente aos meus pais, Severino Batista de Oliveira e Helena Maria Alves de Oliveira pelo incrível esforço para que eu tivesse direito à educação, desde a básica, até a minha chegada a universidade. E assim continuam até hoje, me apoiando e torcendo por mim. À minha irmã, Ravana Alves de Oliveira, pelo apoio incondicional. Sem vocês não teria chegado até aqui. Essa conquista é nossa! Amo vocês!

Agradeço a minha filha Maria Luísa de Oliveira Ferreira, minha Malu, por ela não venho medindo esforços para conseguir alcançar meus objetivos. A chegada dela me fez querer alcançar voos mais altos, a vida ao seu lado me motiva e me faz querer sempre o melhor, a sua alegria faz as coisas serem mais leves. Amo você infinitamente!

Agradeço aos meus sogros, Ecilda Maria de Andrade Nascimento e Luiz Alberto do Nascimento, que me aceitaram com o coração aberto e me acolheram como verdadeiros pais. Me sinto muito abençoada por ter vocês em meu caminho. Sei que torcem por mim verdadeiramente.

Agradeço ao meu marido, Luiz Alberto do Nascimento Filho, que vem sendo durante todo o tempo um amigo e companheiro. Esteve comigo todos os dias do meu mestrado, me ajudando principalmente no trabalho de campo, indo comigo fazer as coletas e exposições necessárias para desenvolver esse trabalho. Com o seu amor e companheirismo ele tornou essa trajetória mais divertida. Sou grata a tudo que você vem fazendo por mim. Obrigada por ter abraçado o meu sonho e o tornado seu também. Essa conquista também é sua.

Agradeço a minha Orientadora Dra. Claudia Rohde, por ter-me aceitado desde a graduação. Obrigada pelas oportunidades e por permitir que eu desenvolvesse esse trabalho. Obrigada, por toda dedicação e paciência, por compreender as minhas limitações e estar sempre disposta a ajudar. A senhora é um exemplo de profissional e uma pessoa admirável.

Agradeço a todos que fazem parte do laboratório de Genética da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória. Obrigada por me ajudarem com o dia-a-dia do laboratório e com os experimentos. Agradeço ao grupo de pesquisa mutagênese, e especialmente a Érima Maria, André Severino, Edson Francisco, Gislaine Pereira e Samuel Lima, que estiveram em todos os experimentos do meu mestrado, sem eles esse trabalho não seria possível.

Agradeço aos que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, aos colegas de mestrado e à CAPES.

Enfim, agradeço a cada pessoa, amigos e familiares que participaram direta e indiretamente desse trabalho e que torceram para que eu pudesse chegar até aqui.

“Não me sinto obrigado a acreditar que o mesmo Deus que nos dotou de sentidos, razão e intelecto, pretenda que não os utilizemos”.

Galileu Galilei

RESUMO

A radiação ionizante pode causar diversas alterações genéticas nos organismos, tais como as mutações no DNA e o desenvolvimento de câncer na população humana. Esse é um tema relevante na região semiárida do Nordeste do Brasil, pois são encontradas grandes reservas de Urânio, um elemento radiativo instável cujo decaimento dá origem ao gás radônio, que tem grande capacidade de dispersão na água, ar e solo. No estado do Rio Grande do Norte está localizada a cidade de Lajes Pintadas, situada sobre um afloramento rochoso denominado Província Pegmatítica da Borborema. Diante disso, foi objetivo deste estudo investigar o efeito da radiação natural sobre organismos residentes, tais como *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae), a espécie mais abundante entre os drosofilídeos locais. Para tanto, foi aplicada a metodologia do ensaio cometa, em hemócitos de larvas cultivadas por seis dias em Lajes Pintadas e em Santa Cruz, no estado do Rio Grande do Norte. Como grupo controle negativo ambiental foram coletados indivíduos no Parque Nacional do Catimbau, em Pernambuco, local sem registro de radiação natural ou poluição. Os experimentos foram realizados em dois momentos (2017 e em 2018), com diferentes linhagens de indivíduos residentes, e em triplicatas. A fim de verificar presença de radiorresistência, organismos residentes nos dois municípios e no local controle ambiental foram primeiramente coletados, depois cultivados em laboratório por três meses, e seus descendentes foram expostos aos locais de origem (Lajes Pintadas e Santa Cruz). Após a coleta da hemolinfa em larvas crescidas por seis dias nos locais, foi aplicada a metodologia do ensaio cometa, que permitiu o registro dos níveis de danos genéticos induzidos pelos ambientes naturais. Foi confirmada a hipótese de que indivíduos residentes em Lajes Pintadas são radiorresistentes, uma vez que o grupo controle ambiental sofreu danos genéticos estatisticamente superiores. Em Santa Cruz tanto o grupo de residentes quanto o grupo controle ambiental não sofreram danos genéticos. Este resultado, entretanto, foi observado em 2018 e não em 2017, o que não pode ser explicado nas condições experimentais deste trabalho. Os resultados obtidos em Lajes Pintadas com *Z. indianus* corroboram resultados anteriores, feitos com *Drosophila melanogaster* do mesmo local, e indicam que esta condição adaptativa se estabeleceu nas últimas duas décadas de colonização da espécie no semiárido do Nordeste, desde seu primeiro registro no Brasil, em 1999.

Palavras-chave: Ensaio cometa. Lajes Pintadas. Radiação natural.

ABSTRACT

Ionizing radiation can cause various genetic changes in organisms, such as mutations in the DNA and the development of cancer in human populations. This is a relevant topic in the semi-arid region of Northeast Brazil, because large reserves of uranium are found, an unstable radiative element whose decay gives rise to radon gas, which has great dispersion capacity in water, air and soil. In the state of Rio Grande do Norte is located the city of Lajes Pintadas, situated on a rocky outcrop called *Província Pegmatítica da Borborema*. Therefore, it was the objective of this study to investigate the effect of natural radiation on resident organisms, such as *Zaprionus indianus* (Diptera, Drosophilidae), the most abundant species among local drosophilids. For this purpose, the methodology of the comet assay was applied in hemocytes of six-day-old larvae grown in Lajes Pintadas and Santa Cruz, State of Rio Grande do Norte. As an environmental negative control group, individuals were collected in the Catimbau National Park, in Pernambuco, a place with no natural radiation or pollution. The experiments were performed in two moments (2017 and in 2018) with different lineages of resident individuals, and in triplicates. In order to verify the presence of radioresistance, organisms living in the two municipalities and in the local environmental control were first collected, then cultivated in the laboratory for three months, and their descendants were exposed to the places of origin (Lajes Pintadas and Santa Cruz). After the collection of hemolymph in larvae grown for six days at the sites, the methodology of the comet assay was applied, which allowed the recording of the levels of genetic damages induced by natural environments. It was confirmed the hypothesis that individuals residing in Lajes Pintadas are radioresistant, since the environmental control group suffered statistically superior genetic damages. In Santa Cruz, both the resident group and the environmental control group did not suffer genetic damage. This result, however, was observed in 2018 and not in 2017, which can not be explained in the experimental conditions of this work. The results obtained in Lajes Pintadas with *Z. indianus* corroborate previous results, done with *Drosophila melanogaster* from the same site, and indicate that this adaptive condition was established during the last two decades of colonization of the species in the Northeast, since its first registration in the Brazil, in 1999.

Key words: Comet assay. Lajes Pintadas. Natural radiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Série de decaimento do Urânio (U^{238}) a partir da emissão de partículas alfa (α), até sua estabilização na forma de Chumbo (Pb^{206}). Fonte: Modificado de Taylor et al., (2001). 15

Figura 2. Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste. Na ampliação, detalhes do estado do Rio Grande do Norte e Lajes Pintadas. (Fonte: Verçosa et al., 2017). 16

Figura 3. Foto de um macho (M) e fêmea (F) da espécie *Zaprionus indianus*. 18

ARTIGO

Figura 1. Imagem de uma caixa de população, elaborada para a exposição de drosofilídeos aos ambientes de estudo, confeccionada com garrafa PET transparente, tela fina, meio de cultivo no seu interior e uma cobertura para proteção em caso de chuva (VERÇOSA et al., 2015). 28

Figura 2. Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster*, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente, de acordo com Verçosa et al., (2017). 29

Figura 3. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano (%) obtidos em hemócitos das larvas de *D. melanogaster* e *Z. indianus* tratados com água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida. Linhas verticais indicam valores médios de desvio padrão. 30

Figura 4. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano obtidos nos hemócitos das larvas de *Z. indianus* após os tratamentos em laboratório com água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida, e exposição nas cidades de Lajes Pintadas e Santa Cruz, em outubro de 2017. 32

Figura 5. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano obtidos nos hemócitos das larvas de *Z. indianus* após os tratamentos em laboratório com água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida, e exposição nas cidades de Lajes Pintadas e Santa Cruz, em dezembro de 2018. 34

LISTA DE TABELAS

ARTIGO

- Tabela 1. Avaliação dos níveis de dano genético (0 a 4), Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) em *Drosophila melanogaster* e na espécie teste *Zaprionus indianus*, submetidas a três tratamentos realizados em laboratório - um com água destilada, outro com doxorrubicina e outro com ciclofosfamida - em três réplicas (a, b, c). 29
- Tabela 2. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nas espécies estudadas. 30
- Tabela 3. Primeiro experimento de avaliação do dano genético em hemócitos de *Zaprionus Indianus* após exposição dos organismos em laboratório (água destilada, doxorrubicina e ciclofosfamida) e em campo, nas cidades de Lajes Pintadas (LP) e Santa Cruz (SC) em três réplicas (a, b, c). 31
- Tabela 4. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nos diferentes tratamentos feitos com *Z. indianus* em outubro de 2017. 32
- Tabela 5. Segundo experimento de avaliação do dano genético em hemócitos de *Zaprionus Indianus* após exposição dos organismos em laboratório (água destilada, doxorrubicina e ciclofosfamida) e em campo, nas cidades de Lajes Pintadas (LP) e Santa Cruz (SC) em três réplicas (a, b, c). 33
- Tabela 6. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nos diferentes tratamentos feitos com *Z. indianus* em dezembro de 2018 34

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Radiação natural	14
3.2 Lajes Pintadas.....	15
3.3 Radiorresistência.....	16
3.4 Família Drosophilidae.....	17
3.5 Gênero <i>Zaprionus</i>	17
4 ARTIGO.....	19
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

A radiação natural é uma das fontes naturais de indução de mutação e de ameaça à integridade genômica (BEAM *et al.*, 1954). Esse tipo de radiação vem sendo bastante estudada no estado do Rio Grande do Norte, com investigações sobre o potencial genotóxico e mutagênico da água de açudes e exposição ao gás Radônio na atmosfera (CAMPOS *et al.*, 2012; DANTAS *et al.*, 2013; CHAVES *et al.*, 2016; VERÇOSA *et al.*, 2017). Esses estudos são realizados especialmente na cidade de Lajes Pintadas, devido aos elevados índices de radiação associados aos elementos químicos resultante do decaimento do Urânio e Tório, especialmente o gás Radônio (BARILLET *et al.*, 2011; CAMPOS *et al.*, 2012).

Outro aspecto também estudado no local é o fenômeno da radiorresistência, que se traduz na capacidade de um organismo em se adaptar à radiação natural e, mesmo exposto, não sofrer graves danos em seu material genético (BEAM *et al.*, 1954). Estudos pioneiros realizados por Castro (2016), demonstraram a ocorrência de radiorresistência na espécie *Drosophila melanogaster*, coletada na sede do município de Lajes Pintadas, no entorno do açude Riacho da Cachoeira.

O mesmo autor e seus colaboradores identificaram, nessa cidade, elevada abundância da espécie de drosofilídeo invasora no Brasil, *Zaprionus indianus* (CASTRO *et al.*, 2015). Trata-se de uma espécie exótica no Brasil e sua ocupação no país tem sido acompanhada nos últimos 19 anos. Seu primeiro registro foi feito no interior do estado de São Paulo, Brasil (VILELA *et al.*, 1999), e desde lá tem sido registrada sua ocorrência e dispersão em diferentes biomas da região Nordeste (SANTOS *et al.*, 2003; ROHDE *et al.*, 2010). A elevada abundância desta espécie na cidade de Lajes Pintadas (CASTRO *et al.*, 2015) sugere que a mesma está muito bem adaptada, apesar do elevado nível de radiação natural presente no ar e na água do município.

Por meio da metodologia do ensaio cometa, este trabalho se propõe a investigar se *Z. indianus* proveniente de Lajes Pintadas mesmo sendo uma espécie introduzida no Brasil há cerca de 20 anos, já desenvolveu radiorresistência, a exemplo das populações locais de *D. melanogaster* (CASTRO, 2016). Os resultados contribuem para um melhor entendimento do fenômeno da radiorresistência em populações naturais de drosofilídeos, abrindo caminho para novas investigações sobre a temática que relaciona a saúde humana e o meio ambiente, por meio de adaptações evolutivas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a possível ocorrência de radiorresistência no organismo *Zaprionus indianus* nativo da cidade de Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte.

2.2 Específicos

- Validar a metodologia do ensaio cometa na espécie *Zaprionus indianus* a fim de investigar possíveis danos sofridos pela espécie em locais de sua elevada ocorrência;
- Analisar o efeito genotóxico associado ao gás Radônio em amostras da espécie de diferentes locais, como Lajes Pintadas e Santa Cruz, no Rio Grande do Norte, e Buíque (Parque Nacional do Catimbau), em Pernambuco;
- Identificar a possível ocorrência de radioresistência em *Z. indianus* abrindo novas perspectivas de estudos com as populações nativas de locais com índices de radiação natural acima dos recomendados como seguros.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Radiação natural

As radiações, que se definem como ondas eletromagnéticas ou partículas que se propagam com uma determinada velocidade, são uma das fontes naturais de indução de mutação e uma ameaça à integridade genômica. Uma das ameaças desta integridade está relacionada aos fatores exógenos, como a radiação ionizante, capazes de atuar como agentes genotóxicos e mutagênicos ambientais (MOSQUEIRA *et al.*, 2004).

Levantamentos realizados pela Agência Internacional de Energia Atômica (AIEA, 2010) apontam o Brasil com uma das maiores fontes de reserva mundial de Urânio, possuindo a sétima maior reserva geológica, ficando atrás dos Estados Unidos, Canadá, África do Sul, Rússia, Cazaquistão e Austrália. Esse elemento químico, disponível no interior da crosta terrestre, é o mais pesado dentre os átomos de ocorrência natural. No entanto, processos naturais e antrópicos contribuem para a sua redistribuição em todos os compartimentos ambientais, desde rochas, solos, águas superficiais e subterrâneas, ar, até mesmo em plantas e animais (MARCON *et al.*, 2010).

De acordo com Mettler Jr. e Voelz (2002), Chaudhry (2008) e Wilson *et al.*, (2014) a radiação ionizante proveniente do decaimento do Urânio (**Figura 1**) é capaz de interferir nas funções em todos os níveis de organização celular, provocando mutações no DNA. Por meio do estresse oxidativo pode ser também uma via de dano genotóxico e de neurotoxicidade (BARILLET *et al.*, 2011).

A problemática envolvendo o Urânio e outros elementos resultantes do seu decaimento, incluindo a liberação de subprodutos na atmosfera como o gás Radônio, pode ser encontrada no semiárido do estado do Rio Grande do Norte, em especial no município de Lajes Pintadas. Estudos demonstram que os efeitos estão associados ao consumo ou contato com a água do açude local da cidade (Riacho da Cachoeira), que apresenta elevadas concentrações de metais (DANTAS *et al.*, 2017) ou à exposição ao ar, que da mesma forma que o açude, contém o gás Radônio em níveis não seguros para a saúde humana e meio ambiente.

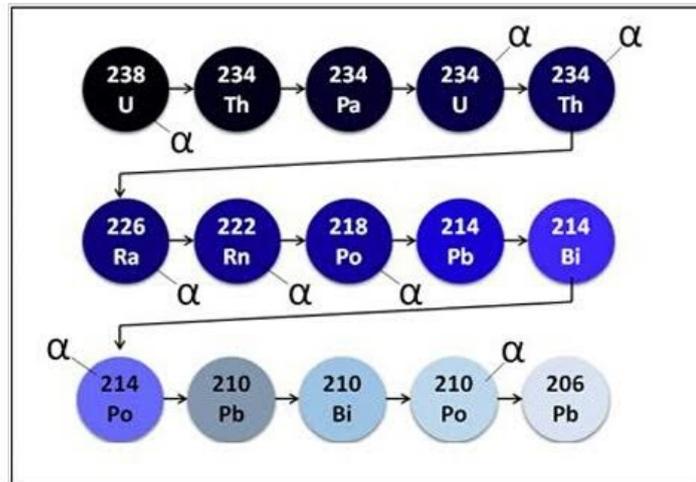


Figura 1. Série de decaimento do Urânio (U^{238}) a partir da emissão de partículas alfa (α), até sua estabilização na forma de Chumbo (Pb^{206}). Fonte: Modificado de Taylor et al., (2001).

3.2 Lajes Pintadas

Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2014) o município de Lajes Pintadas, com 4.614 habitantes, está situado na mesorregião do Agreste Potiguar (**Figura 2**), distante 135 quilômetros da capital Natal. O município está inserido em uma área geológica de 10.000 km², definida por Scorza (1994) como Província Pegmatítica da Borborema, com presença de granitos pegmatíticos - as rochas holocristalinas - que apresentam granulação grosseira e com tamanhos muito variáveis. Nesta zona geológica são encontradas elevadas concentrações de Urânio (entre 0,4 ppm e 7,8 ppm), Tório (entre 0,1 ppm e 21 ppm) e Potássio (entre 2% e 5,2%) (BARILLET *et al.*, 2011).

Com base no Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010) ocorreram 415 casos de câncer em um total de 4.614 habitantes de Lajes Pintadas, um número superior ao registrado na capital Natal, que foi de 353 novos casos (806.203 habitantes). Os tipos de câncer mais comuns registrados no município de Lajes Pintadas foram os de orofaringe, estômago e pulmão. Estes casos são associados à exposição da população à radiação natural, e aos seus subprodutos, como o Radônio e os metais pesados (SAMET, 2011).

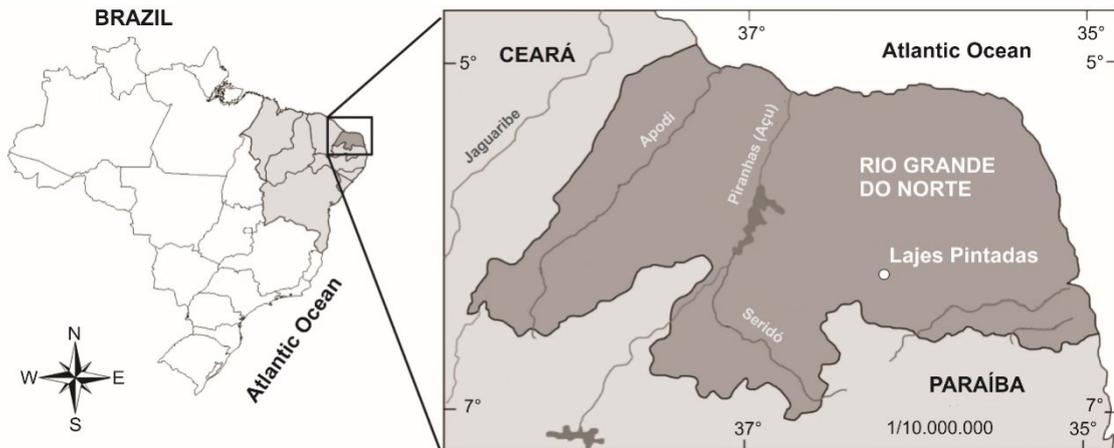


Figura 2. Mapa do Brasil, com destaque para a região Nordeste. Na ampliação, detalhes do estado do Rio Grande do Norte e Lajes Pintadas. (Fonte: Verçosa et al., 2017).

3.3 Radiorresistência

Alguns organismos, mesmo expostos a níveis elevados de radiação ionizante, podem se adaptar às condições ambientais e não sofrer grandes danos em seu material genético (BEAM *et al.*, 1954). A esta adaptação à radiação dá-se o nome de radiorresistência, que pode estar ligada a um mecanismo de seleção natural associado a uma maior eficiência no reparo do DNA (MATTIMORE; BATTISTA, 1996).

Em Lajes Pintadas, estudos feitos por Castro (2016) demonstram a ocorrência de radiorresistência na espécie *Drosophila melanogaster* coletada na cidade. *Drosophila melanogaster* é considerada um organismo modelo e, por isso, é muito utilizada em trabalhos com enfoque na toxicidade do DNA (GRAF *et al.*, 1984).

Castro (2016) realizou uma primeira abordagem a respeito da ocorrência de radiorresistência coletando adultos de *D. melanogaster* em Lajes Pintadas. O autor cultivou os insetos em condições de laboratório por um período de seis meses, retornando ao campo para a exposição dos descendentes de *D. melanogaster* à radiação natural. Após seis dias de exposição ao ar no local, as larvas da espécie foram submetidas ao ensaio cometa, revelando ausência de danos genéticos, em comparação com uma população não nativa (linhagem Oregon-R) submetida aos mesmos procedimentos. As medidas de dano genético foram obtidas por meio do no ensaio cometa (Índice de Dano e Frequência de Dan). O autor repetiu os experimentos após 12 meses de cultivo da linhagem nativas em laboratório, encontrando os mesmos resultados indicativos de radiorresistência ao ambiente de Lajes Pintadas. O conjunto dos resultados indicou que as linhagens nativas, mesmo após seis

meses e um ano de cultivo em laboratório, permaneciam geneticamente diferenciadas, preservando sua condição de radiorresistência ao ambiente de Lajes Pintadas. Por outro lado, as linhagens controle da mesma espécie, coletas em local não radioativo (Parque Nacional do Catimbau) se mostraram sensíveis à radiação local, com valores significativamente superiores aos obtidos com a linhagem radiorresistente.

3.4 Família Drosophilidae

Segundo Bächli (2015) a família Drosophilidae está classificada taxonomicamente no Reino Animalia, Filo Arthropoda, Classe Insecta e Ordem Diptera. É bastante diversa e inclui 75 gêneros vigentes (e mais três extintos), com pelo menos 4.200 espécies descritas até o momento. São espécies bem pequenas, cerca de 3 a 5 mm de comprimento, conhecidas como “moscas das frutas”, podendo ser também chamadas de “moscas do vinagre”. Sua alimentação é bem diversificada, podendo incluir desde leveduras encontradas em variados tipos de frutos em estado de decomposição, como flores, fungos e serapilheira. Esses organismos são excelentes modelos biológicos graças a facilidade de seu cultivo em laboratório, rápido ciclo de vida, e grande conhecimento acumulado em mais de 100 anos de estudos na área da genética e evolução, e também na ecologia, biologia molecular, e mutagênese (POWELL, 1997; ROHDE, 2012; VERÇOSA *et al.*, 2017).

3.5 Gênero *Zaprionus*

Segundo Castro *et al.*, (2015), nas coletas realizadas em Lajes Pintadas há grande abundância da espécie invasora no Brasil, *Zaprionus indianus* (subfamília Drosophilinae, família Drosophilidae) (**Figura 3**). Esta espécie, de origem Africana, é a única representante do gênero com ocorrência no continente americano. Seu primeiro registro em nosso país foi feito no final da década de 1990 no interior do estado de São Paulo pelo Dr. Fabio Sene. Desde seu registro formal, feito por Vilela (1999), a espécie vem colonizando diversas regiões do Brasil, com amostragens feitas já no ano 2000 no estado do Rio Grande Sul (CASTRO; VALENTE, 2001) e no mesmo ano, nos estados da Paraíba, Pernambuco e Bahia (SANTOS *et al.*, 2003), o que demonstra um intenso e contínuo processo de invasão da espécie.

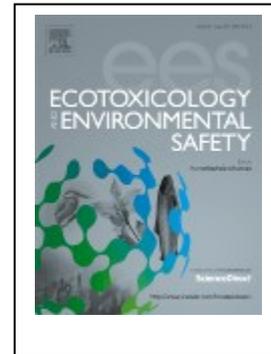


Figura 3. Foto de um macho (M) e fêmea (F) da espécie *Zaprionus indianus*.

Castro et al., (2015) destacam que, dos 7.716 drosofilídeos coletados em Lajes Pintadas no ano de 2014, 5.148 (ou 66%) foram *Z. indianus*. Essa elevada frequência evidencia que a espécie está bem adaptada a este ambiente, apesar do elevado índice de radiação natural. Portanto, seria possível que *Z. indianus* adquirisse esta adaptação genética no tempo em que ela está colonizando a região, que é estimada em 20 anos? A fim de responder a esta pergunta, este trabalho se propôs a estudar o efeito da radiação em diferentes populações desta espécie, que é ecologicamente dominante em Lajes Pintadas. Para isso, foi aplicada a metodologia do ensaio cometa, um método rápido, sensível e de baixo custo, capaz de reconhecer danos imediatos no DNA de células somáticas (JHA, 2008). Esta metodologia foi aplicada pela primeira vez em *D. melanogaster* no ano de 1999, e a partir daí sua utilização tem crescido de forma exponencial (GAIVÃO e SIERRA, 2014; VERÇOSA et al., 2017), com destaque aos trabalhos feitos por nosso grupo de pesquisa testando efeitos da radiação natural, radioresistência e da poluição ambiental (SANTANA 2015; CASTRO, 2016; VERÇOSA et al., 2017; SANTANA et al., 2018).

4 ARTIGO

A ser submetido para *Ecotoxicology and Environmental Safety*
A2 (Biodiversidade), Fator de Impacto: 3,974



Presença de radiorresistência na espécie invasora *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera) no semiárido do Brasil

**Presence of radioresistance in the invasive species *Zaprionus indianus* (Insecta,
Diptera) in the semi-arid region of Brazil**

Rafaela Alves de Oliveira^{1,2}, Ícaro Fillipe de Araújo Castro², Edson Francisco do Carmo Neto², Érika Maria de Amorim², André Severino da Silva², Maria Gislaine Pereira², Samuel Lima de Santana², Cícero Jorge Verçosa², Claudia Rohde²

¹Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente, ²Laboratório de Genética, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil.

Resumo

O Brasil é um país com grandes reservas de Urânio, responsável por uma elevada emissão de radiação natural. Esse elemento é instável e seu decaimento dá origem ao gás Radônio causador de variados tipos de câncer. Uma das reservas de Urânio pode ser encontrada no semiárido do Estado do Rio Grande do Norte, na cidade de Lajes Pintadas, localizada sobre de um afloramento denominado Província Pegmatítica da Borborema. Alguns organismos, mesmo expostos a essa radiação, conseguem se adaptar e não sofrer danos em seu material genético, sendo denominado de radiorresistentes. Neste trabalho foi feito o estudo dos efeitos genotóxicos na espécie invasora *Zaprionus indianus*, que tem grande abundância nas coletas realizadas em Lajes Pintadas, e que poderia ser uma espécie radiorresistente, assim como já foi demonstrado por nosso grupo, para *Drosophila melanogaster*, no mesmo local. Para fins comparativos, indivíduos *Z. indianus* de Santa Cruz, distante 17 km de Lajes Pintadas, e do Parque Nacional do Catimbau (Buíque, Pernambuco) foram também investigadas. Os experimentos em campo foram realizados em dois anos consecutivos (outubro, 2017 e dezembro, 2018) e sempre em triplicatas. O conjunto dos resultados obtidos pelo ensaio cometa indicam que as populações de *Z. indianus* que vivem em Lajes Pintadas, diferente das demais populações estudadas, se adaptaram às condições locais, ao ponto de não sofrerem danos genéticos na mesma proporção que indivíduos não residentes. Esses resultados abrem perspectivas para o aprofundamento do tema, em outros organismos e para o estudo genético das adaptações adquiridas pela espécie *Z. indianus* frente à radioatividade natural de Lajes Pintadas.

Introdução

A radioresistência natural está na interface entre vários ramos da ciência, incluindo a fisiologia, ecologia e evolução (adaptação e tolerância animal). Também está intimamente relacionada à biodiversidade adaptativa, o menos estudado aspecto da biodiversidade, que é agora um problema atual (GRIGORKINA, 2002). A radiorresistência é uma característica fundamental dos organismos, que reflete a capacidade dos processos genéticos em reparar danos no DNA, os quais ocorrem normalmente na natureza (VAISNAV *et al.*, 2014). As emissões de radiação ionizante são, portanto, genotóxicas para as células pois produzem danos de ligações cruzadas, troca de base, quebra de cadeia simples e quebras de cadeia

dupla do DNA (NIKJOO *et al.*, 1998). Além disso, afetam os processos biológicos normais, podendo gerar doenças degenerativas e câncer (UNSCEAR, 2000).

Grande parte da radiação a que os organismos estão expostos é proveniente da natureza e compreende raios cósmicos que vem do espaço, e radionuclídeos que estão presentes no solo, rochas, materiais de construção, ar, água e alimentos (RAMACHANDRAN, 2001). E é graças à capacidade de alguns organismos em se adaptarem a condições de intensa radiação, seja por meio de uma via de proteção, como a produção de antioxidantes, ou por meio de um bom sistema de reparo (BETLEM *et al.*, 2012; HALL; GIACCIA 2012) que diversas espécies habitam locais com estas características naturais. Essa condição adaptativa ainda é pouco estudada, porém já foi observada em bactérias (MATTIMORE; BATTISTA, 1996), em drosofilídeos (BEAM *et al.*, 1954; CORDEIRO *et al.*, 1973; VAISNAV *et al.*, 2014; CASTRO, 2016) e em células de mamíferos, que são consideradas menos radorresistentes do que células de outras espécies (GRIGORKINA, 2002; HAFER *et al.*, 2007; HOWELL *et al.*, 2012). É possível a menor radorresistência em mamíferos esteja relacionada com o peso corporal, de forma que quanto menor o peso do animal, maior sua taxa metabólica, e menor o tempo de início da restauração de células correspondentes aos verdadeiros neutrófilos sanguíneos (SHCHERBOVA, 1987; GRIGORKINA, 2002). Sendo assim, insetos parecem ser menos resistentes à radiação do que bactérias, protozoários e vírus, porém mais radorresistentes que vertebrados superiores (ARTHUR *et al.*, 2015).

De acordo com o trabalho desenvolvido por Vaisnav *et al.*, (2014), existe grande variabilidade entre linhagens do inseto *Drosophila melanogaster* (Diptera, Drosophilidae) quanto à resposta à radioresistência induzida, em condições laboratoriais. A análise do rico material genético, de mais de 150 diferentes linhagens de *D. melanogaster* feito pelos autores relata a presença de variabilidade entre linhagens em resposta à radiação. Além disso, indica duas dezenas de genes atuantes na radioresistência, sendo nove deles homólogos ao genoma humano. Além disso, segundo os autores, as linhagens que se mostraram radioresistentes nos experimentos laboratoriais nunca mais voltaram a ser sensíveis à radiação induzida. Este resultado vem de encontro com os achados de Castro (2016), que observou linhagens de *D. melanogaster* que vivem na cidade de Lajes Pintadas, no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil, se mostraram radorresistentes. E esse fenômeno foi observado mesmo após várias gerações de cultivo em laboratório. O autor registrou a radorresistência por meio do Ensaio cometa, em descendentes da linhagem residente em Lajes Pintadas, mesmo após um ano de sua coleta em campo e manutenção em condições de cultivo em laboratório, quando novamente foram expostas às condições de radiação natural em Lajes Pintadas. Este trabalho se propôs a analisar outra espécie de drosofilídeo,

Zaprionus indianus, que é muito abundante em Lajes Pintadas (CASTRO *et al.*, 2015) e que colonizou há pouco mais de 19 anos o continente Americano, desde seu primeiro registro em São Paulo, Brasil, em 1999 (VILELA, 1999).

Material e Métodos

Validação do ensaio cometa em *Z. indianus*

Para execução do Ensaio cometa com a espécie *Z. indianus*, fez-se necessário um teste inicial de validação da metodologia na espécie, e comparação com os resultados aplicados com *Drosophila melanogaster*, utilizada nos estudos anteriores feitos por nosso grupo de pesquisa. Para esta validação, foram estabelecidos em condições de laboratório três grupos de tratamento: um grupo submetido à água destilada (grupo controle negativo), e dois grupos controle positivos, um submetido ao composto mutagênico Doxorubicina (1 mg/mL) e outro grupo submetido à Ciclofosfamida (1 mg/mL). Nestes testes larvas com 72h de vida, das duas espécies (*D. melanogaster* linhagem Oregon-R e *Z. indianus* linhagem coletada em Vitória de Santo Antão, Pernambuco), permaneceram por 24h (tratamento crônico) em contato com meio de cultivo a base de purê de batata (Yoki), hidratado com as soluções.

Coleta e estabelecimento das linhagens

Amostras de adultos de *Zaprionus indianus* foram obtidas de uma coleta realizada em maio/2017 no Parque Nacional do Catimbau (08°30'57"S, 37°20'59"W) município de Buíque, Estado de Pernambuco, e se constituíram no grupo controle negativo ambiental. Na cidade de Lajes Pintadas (06°08'46"S, 036°06'54"W) e na cidade de Santa Cruz (06°13'16.5"S, 036°01'41.5"W) no Rio Grande Norte (RN), foram realizadas coletas de linhagens locais da espécie, em dois momentos: em junho/2017 e em agosto/2018. Coletas de populações locais, aqui denominadas de residentes, foi também realizado na cidade de Santa Cruz-RN, pelo fato dessa cidade ser distante apenas 17 km de Lajes Pintadas, e ser um local sem registro de radiação natural, como é a cidade de Lajes Pintadas.

Para as coletas de drosofilídeos adultos em campo foram utilizadas armadilhas feitas de garrafas plásticas (TIDON; SENE, 1988), contendo banana para atração dos indivíduos. As armadilhas foram penduradas nos locais de estudo, a 1,5 m do chão, durante 2 dias. Trazidas ao Laboratório de Genética, no Centro Acadêmico de Vitória da UFPE, 100 adultos de cada um dos três locais (Catimbau, Lajes Pintadas e Santa Cruz) foram identificados de acordo com sua morfologia externa e mantidos em cultivo em tubos de vidro com meio de cultura padrão, a base de farinha de milho, centeio, açúcar, fermento biológico e ágar.

Depois de ampliar o número de indivíduos dos cultivos, os indivíduos descendentes foram expostos em Lajes Pintadas e Santa Cruz, em caixas de populações construídas segundo especificações de Verçosa *et al.*, (2015) (**Figura 1**). A exposição dos organismos em campo foi realizada em outubro/2017 (primeiro experimento) e em dezembro/2018 (segundo experimento). Para esta etapa, caixas de populações contendo os organismos residentes de Lajes Pintadas e residentes de Santa Cruz foram levadas para seus respectivos locais de origem, para um período de exposição de seis dias. Apenas a população coletada no Parque Nacional do Catimbau foi levada aos dois locais, para servir de controle negativo ambiental. Todos os experimentos foram realizados em triplicada.

Como mencionado, esta etapa em campo foi realizada em dois diferentes momentos em 2017 e em 2018. Em cada período, seis caixas de populações foram expostas em Lajes Pintadas (três com adultos residentes LP e três com organismos do controle ambiental) e seis foram expostas em Santa Cruz (três com adultos residentes SC e três com organismos do controle ambiental). Cada caixa de população com 120 adultos *Z. indianus* foi pendurada em local sombreado, assim permanecendo por seis dias, tempo necessário para ovoposição e desenvolvimento de larvas descendentes, até o terceiro estágio. Após este tempo, as caixas foram levadas ao Laboratório de Genética para processamento da hemolinfa e início do Ensaio cometa, seguindo especificações metodológicas de Verçosa *et al.*, (2017).

Ensaio cometa

O Ensaio cometa é uma metodologia da área da mutagênese, também conhecido como eletroforese de célula única. É um teste muito utilizado em diversas abordagens e organismos biológicos, tendo como objetivo detectar danos ao DNA (COLLINS *et al.*, 2014). É um método rápido, que utiliza poucas células, sensível e de baixo custo (KOPPEN *et al.*, 1999). Foi originalmente desenvolvido por Östling e Johanson em 1984, e aprimorado por Singh e colaboradores em 1988 (SINGH *et al.*, 1988). Esse teste, que era utilizado com outros organismos, como pequenos mamíferos, passou a ser aplicado, desde 1999, no organismo modelo *D. melanogaster* (GAIVÃO; SERRA, 2014), o que abriu novas perspectivas para seu uso ao invés de mamíferos. O ensaio cometa detecta quebras imediatas sofridas pelo material genético das células (SINGH *et al.*, 1988). O teste é feito após as células serem colocadas em lâminas com agarose. Após serem rompidas as membranas das células, por meio de um processo de lise, o DNA permanece ligado a matriz celular, e é denominado de nucleóide. Após ser submetido a uma etapa de eletroforese, os fragmentos de DNA danificado migram em direção ao polo positivo da cuba de eletroforese, fazendo com que se forme uma cauda, com aparência similar a um cometa. Quanto mais

rápida a migração, maior a cauda e a intensidade do dano genético (AZQUETA; COLLINS; 2013; TICE *et al.*, 2000). Para esta metodologia foram seguidos os passos abaixo descritos.

Extração da hemolinfa: Foi extraída hemolinfa de 60 larvas, de cada uma das três réplicas, de cada um dos grupos expostos, seguindo a descrição de Verçosa *et al.*, (2017). O material biológico foi transferido para uma placa escavada contendo solução EDTA (anticoagulante) e observadas ao microscópio estereoscópico. Com a ajuda de uma pinça e de um bisturi foi realizado um corte sagital em cada uma das 60 larvas, de forma a permitir a coleta conjunta da hemolinfa dos 60 indivíduos. Esta hemolinfa foi coletada e transferida com micropipeta a um tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, que foi centrifugado duas vezes a 3.000 rpm por 3 minutos. Após o descarte de aproximadamente 100 µL do sobrenadante, foram acrescentados mais 100µL de solução EDTA, completando o volume do tubo novamente para 0,5 mL. Este procedimento foi repetido até a terceira centrifugação a fim de limpar as impurezas e melhorar a qualidade dos preparados celulares.

Montagem das lâminas com agarose: Lâminas histológicas foram previamente lixadas na face superior para facilitar a adesão da agarose à lâmina. Depois de lavadas com água e detergente, foram mergulhadas em álcool e secas ao ar. Após a coleta de 60 µL da suspensão da hemolinfa das larvas de *Z. indianus*, o material foi homogeneizado em 100 µL de solução de 0,5% de agarose de baixo ponto de fusão (agarose LM) a 37°C. Por se tratar de uma etapa fotossensível, esse procedimento foi realizado na ausência de luz. O homogeneizado foi aplicado em lâminas previamente banhadas em agarose padrão e uma lamínula (24 mm x 60 mm) foi colocada sobre o material. Para solidificar a agarose, as lâminas foram submetidas a 4°C por 10 min. Passado esse tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas com o material biológico foram imersas em solução de lise (2,5 M NaCl; 100 mM EDTA; 1 M NaOH; 10 mM Tris; 1% pH 10 adicionada a 1% Triton X-100 e 10% DMSO) e mantidas a 4°C por 72 h. Após este período foi feita a corrida de eletroforese (40 V e 300 mA) por 20 minutos, com alinhamento das lâminas em um cuba de 40 cm. No momento da corrida eletroforética todas as lâminas foram alinhadas com a superfície fosca virada para cima e voltadas para a mesma direção. O tampão da cuba foi composto de 1M NaOH, 200 mM EDTA (pH 13). Após a eletroforese, as lâminas ficaram imersas na solução de neutralização por 15 min e depois em etanol absoluto por 5 min, sendo retiradas e deixadas para secar ao ar. Após a secagem, as lâminas foram armazenadas em caixas próprias a 4°C até serem analisadas.

Análise em microscopia de fluorescência: Para a análise microscópica, as lâminas foram coradas com 50 µL de GelRed, diluído em água na proporção de 1:500 e observadas em microscópio de fluorescência Zeiss-Imager, M2, no aumento de 400X, com o filtro AlexaFluor 546 (excitação de 515-560 nm). As lâminas foram analisadas para a presença de

danos no DNA (cometas), sendo classificados em cinco níveis, de 0 a 4. O nível 0 corresponde ao material genético considerado intacto, ou seja, sem danos causados pela exposição à radiação natural; o nível 1 corresponde a cometas com danos mínimos; o nível 2 a cometas com danos médios; o nível 3 a cometas com danos intensos; e a classe 4 corresponde aos cometas com danos máximos, danos estes que variam de acordo com comprimento e intensidade da cauda, conforme o padrão indicado na **Figura 2**.

Análise estatística: Após a classificação dos níveis de dano observados, foram calculados dois parâmetros: o Índice de Dano (ID) e a Frequência de Dano (FD%). Os valores obtidos através do ID, para cada indivíduo, podem variar de 0 (totalmente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4). ID foi calculado através da seguinte fórmula:

$$\text{ID total} = 0.(\text{n}^\circ \text{ de cometas classe 0}) + 1.(\text{n}^\circ \text{ classe 1}) + 2.(\text{n}^\circ \text{ classe 2}) + 3.(\text{n}^\circ \text{ classe 3}) + 4.(\text{n}^\circ \text{ classe 4})$$

O segundo parâmetro, FD%, foi calculado como a porcentagem de todos os cometas danificados (classe 1 a classe 4) em relação ao total de cometas contados, que vai da classe 0 a classe 4 (nº total). Neste caso, foi aplicado o seguinte cálculo:

$$\text{FD\%} = [(\text{n}^\circ \text{ total} - \text{n}^\circ \text{ classe 0}) \cdot 100] / \text{n}^\circ \text{ total}$$

A análise estatística dos resultados foi feita pela Análise da Variância (AMOVA) e pós teste de Bonferroni, conforme Castro (2016) e Verçosa *et al.*, (2017). O ID e FD % obtidos foram comparados com os grupos controle utilizando-se o *software* STATA versão 12, sendo o nível de significância estabelecido em $p \leq 5\%$ em todos os testes.

Resultados e Discussão

Validação do ensaio cometa em Z. indianus

Os resultados de validação do Ensaio cometa, realizado tanto em *D. melanogaster* quanto na espécie teste *Z. indianus*, estão descritos na **Tabela 1**. Foram contabilizados os níveis de dano de 0 a 4 e calculados seus respectivos ID e FD% (indicados por cada réplica), além dos valores ID e FD% médios e os respectivos desvio padrão (SD).

Conforme o esperado, os valores médios de ID e FD% das réplicas de *D. melanogaster* foram baixos no grupo controle negativo, tratado com água destilada (ID=21,3 e FD%= 7,0), e foram altos após tratamento com os compostos genotóxicos doxorubicina (ID=139,7) e FD%= 65,7) e ciclofosfamida (ID=146,7 e FD%= 56,33). Valores semelhantes foram obtidos para *Z. indianus*, conforme indicado na **Figura 3**. A análise estatística

aplicada aos resultados médios obtidos de ID e FD% (**Tabela 2**) indicam que não houve diferenças significativas ($P \geq 0,05$) entre as duas espécies, quando comparados os mesmos tratamentos entre si. A única exceção foi para valores de FD%, para o composto doxorubicina, que demonstrou uma maior sensibilidade a danos em *Z. indianus*. O conjunto de resultados indica grande semelhança na resposta das espécies aos compostos utilizados como controle positivo e controle negativo, o que garantiu a continuidade dos estudos em campo, com diferentes populações de *Z. indianus*.

Primeiro experimento de exposição de Z. indianus em Lajes Pintadas e Santa Cruz

Após a validação do ensaio cometa em *Z. indianus* foram realizados os testes de radiorresistência com indivíduos expostos em Lajes Pintadas e em Santa Cruz. Os diferentes tratamentos com *Z. indianus* foram assim determinados:

- Indivíduos residentes em Lajes Pintadas (Residentes LP);
- Indivíduos coletados no Parque Nacional do Catimbau e expostos em Lajes Pintadas (Controle Ambiental em LP);
- Indivíduos residentes em Santa Cruz (Residentes SC);
- Indivíduos coletados no Parque Nacional do Catimbau e expostos em Santa Cruz (Controle Ambiental em SC).

Após a aplicação do primeiro experimento, feito tanto com indivíduos coletados em junho/2017 (e expostos em outubro/2017 em Lajes Pintadas e Santa Cruz) quanto com o grupo controle ambiental nos dois locais, foram obtidos os resultados indicados na **Tabela 3** (níveis de dano 0 a 4, ID, FD% e os valores médios obtidos entre as réplicas, e o desvio padrão). Na **Tabela 4** estão apresentados os resultados da análise estatística, par a par, entre as médias de ID e FD% obtidos entre todos os tratamentos feitos com *Z. indianus*. Uma síntese dos resultados comparativos do primeiro experimento encontra-se nos gráficos da **Figura 4**.

Conforme indicado nas tabelas e figuras acima, os indivíduos residentes de Lajes Pintadas não sofreram danos genéticos quando expostos novamente neste local, mesmo tendo passado três meses de cultivo em laboratório. Já os indivíduos do grupo controle ambiental sofreram danos genéticos após exposição em Lajes Pintadas. Ambos difeririam estatisticamente entre si, tanto para ID quanto FD%. Estes resultados se justificam se os indivíduos residentes de Lajes Pintadas forem radiorresistentes, da mesma forma que indivíduos *D. melanogaster* deste mesmo também foram (CASTRO, 2016). Conforme o

autor há evidências de que Lajes Pintadas apresenta níveis elevados de radiação natural), relacionada ao gás Radônio (Verçosa *et al.*, 2017), que pode ser considerada uma força evolutiva importante capaz de selecionar indivíduos mais aptos e radorresistentes, ao longo das gerações.

Por outro lado, um resultado não esperado foi obtido com os indivíduos residentes de Santa Cruz, que ao serem expostos em seu local de origem apresentam elevado nível de dano genético (ID e FD%), ambos estatisticamente superiores ao grupo controle negativo ambiental. Estes valores foram, inclusive, estatisticamente semelhantes aos obtidos nos grupos controle positivo (doxorrubicina e ciclofosfamida), e contrastam muito com os resultados de baixo ID e FD% do controle ambiental. Diante deste quadro foi realizado um novo experimento em campo, conforme descrito no item abaixo. Neste segundo experimento foi feita nova coleta de adultos residentes, o que significa uma nova linhagem genética testada, nas mesmas condições experimentais do primeiro grupo testado.

*Segundo experimento de exposição de *Z. indianus* em Lajes Pintadas e Santa Cruz*

Após a aplicação do segundo experimento, repetido para nova linhagem de indivíduos de Lajes Pintadas e Santa Cruz (coletados em agosto/2018 e expostos em dezembro/2018) foram obtidos os resultados indicados na **Tabela 5**. Na **Tabela 6** estão apresentados os resultados da análise estatística, par a par, entre as médias de ID e FD% obtidos entre todos os tratamentos feitos com *Z. indianus*. Uma síntese dos resultados comparativos deste segundo experimento encontra-se nos gráficos da **Figura 5**. Para este segundo experimento foi exposta a mesma linhagem *Z. indianus* coletada em maio/2017, no Parque Nacional do Catimbau, como controle ambiental.

Conforme indicado nas tabelas e figuras acima, os indivíduos residentes de Lajes Pintadas novamente não sofreram danos genéticos quando expostos em seu local de origem, enquanto o grupo controle ambiental sofreu danos genéticos evidenciados pelos elevados valores de ID e FD%. Mais uma vez foi observado que indivíduos residentes de Lajes Pintadas são radorresistentes. Conforme o esperado, neste segundo experimento realizado em Santa Cruz não houve danos genéticos nem na linhagem residente, nem na linhagem controle ambiental, reforçando a hipótese original de que Santa Cruz difere de Lajes Pintadas quanto aos riscos genotóxicos, mesmo que a distância entre os locais seja de apenas 17 km.

O conjunto dos resultados dos dois experimentos, realizados em 2017 e 2018 e, Lajes Pintadas enriquecem as evidências da presença de adaptações em insetos à radiação natural deste local. Ao mesmo tempo os resultados indicam que populações de espécies de

drosofilídeos recém introduzidos nestes locais podem se adaptar em um tempo estimado de pelo menos 20 anos, como é o caso de *Zaprionus indianus* no semiárido do Nordeste do Brasil. O fato desta espécie invasora ter sido pela primeira vez encontrada no Nordeste no ano 2000, conforme Santos *et al.*, (2003) em Sobradinho, Bahia, dá pistas de um tempo mínimo para a ocorrência deste fenômeno de radiorresistência em Drosophilidae. Cabe destacar que algumas espécies desta família, tal como *D. melanogaster* podem gerar 20 gerações de descendentes a cada ano (ROHDE, 2012). Refletida essa informação em nossos resultados com *Z. indianus* sugerimos que a radiorresistência foi uma adaptação adquirida nos últimos 17 anos, ao longo de 300 ou 340 gerações selecionadas para sobreviver aos efeitos da radiação natural observada em Lajes Pintadas, semiárido do Nordeste do Brasil.

FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Imagem de uma caixa de população, elaborada para a exposição de drosofilídeos aos ambientes de estudo, confeccionada com garrafa PET transparente, tela fina, meio de cultivo no seu interior e uma cobertura para proteção em caso de chuva (VERÇOSA *et al.*, 2015).



Figura 2. Padrão visual dos cinco níveis de classificação de dano genético (0 a 4) baseada no comprimento e quantidade de DNA na cauda dos cometas. As imagens foram obtidas de hemócitos de larvas de *Drosophila melanogaster*, corados por GelRed™ em microscopia fluorescente, de acordo com Verçosa *et al.*, (2017).

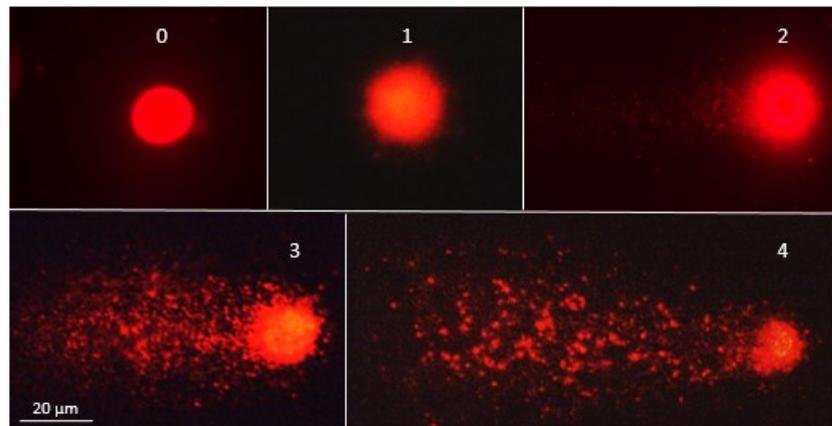


Tabela 1. Avaliação dos níveis de dano genético (0 a 4), Índice de Dano (ID) e Frequência de Dano (FD%) em *Drosophila melanogaster* e na espécie teste *Zaprionus indianus*, submetidas a três tratamentos realizados em laboratório - um com água destilada, outro com doxorubicina e outro com ciclofosfamida - em três réplicas (a, b, c).

Tratamentos	Nível de dano genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
<i>Drosophila melanogaster</i>							
Água ^a	83,00	14,00	3,00	0	0	20,00	17,00
Água ^b	85,00	14,00	1,00	0	0	16,00	15,00
Água ^c	79,00	15,00	6,00	0	0	27,00	21,00
Média	82,33	14,33	3,33	0	0	21,00	17,67
SD	3,06	0,58	2,52	0	0	5,57	3,06
Doxorrubicina ^a	68,00	20,00	9,00	3,00	0	47,00	32,00
Doxorrubicina ^b	52,00	4,00	4,00	16,00	24,00	156,00	48,00
Doxorrubicina ^c	61,00	11,00	19,00	8,00	1,00	77,00	39,00
Média	60,33	11,67	10,67	9,00	8,33	93,33	39,67
SD	8,02	8,02	7,64	6,56	13,58	56,31	8,02
Ciclofosfamida ^a	34,00	17,00	17,00	23,00	9,00	156,00	66,00
Ciclofosfamida ^b	43,00	15,00	6,00	24,00	12,00	147,00	57,00
Ciclofosfamida ^c	22,00	21,00	32,00	19,00	6,00	166,00	78,00
Média	33,00	17,67	18,33	22,00	9,00	156,33	67,00
SD	10,54	3,06	13,05	2,65	3,00	9,50	10,54
<i>Zaprionus indianus</i>							
Água ^a	92,00	1,00	2,00	2,00	2,00	19,00	6,07
Água ^b	94,00	0	1,00	2,00	3,00	20,00	6,00
Água ^c	91,00	1,00	3,00	2,00	3,00	25,00	9,00
Média	92,33	0,667	2,00	2,00	2,67	21,33	7,02

SD	1,528	0,58	1,00	0	0,58	3,21	1,71
Doxorrubicina ^a	28,00	16,00	33,00	21,00	2,00	153,00	72,00
Doxorrubicina ^b	34,00	24,00	30,00	12,00	0	120,00	66,00
Doxorrubicina ^c	41,00	9,00	23,00	17,00	10,00	146,00	59,00
Média	34,33	16,33	28,67	16,67	4,00	139,67	65,67
SD	6,51	7,51	5,13	4,51	5,29	17,39	6,51
Ciclofosfamida ^a	47,00	12,00	14,00	11,00	16,00	137,00	53,00
Ciclofosfamida ^b	28,00	20,00	26,00	9,00	17,00	167,00	72,00
Ciclofosfamida ^c	56,00	2,00	10,00	14,00	18,00	136,00	44,00
Média	43,67	11,33	16,67	11,33	17,00	146,67	56,33
SD	14,29	9,02	8,33	2,52	1,00	17,62	14,29

SD, Desvio padrão.

Tabela 2. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nas espécies estudadas.

Tratamentos	<i>Zaprius indianus</i> (Zi)			<i>Drosophila melanogaster</i> (Dm)		
	Água destilada	Doxorubicina	Ciclofosfamida	Água destilada	Doxorubicina	Ciclofosfamida
Zi Água destilada		0,001*	0,001*	1,000	0,008*	0,001*
Zi Doxorubicina	0,002*		1,000	0,001*	0,042*	1,000
Zi Ciclofosfamida	0,001*	1,000		0,002*	0,503	1,000
Dm Água destilada	1,000	0,002*	0,001*		0,122	0,001*
Dm Doxorubicina	0,072	0,695	0,377	0,070		0,030*
Dm Ciclofosfamida	0,001*	1,000	1,000	0,001*	0,160	

* Indica valores diferentes estatisticamente ($P \leq 0,05$)

Figura 3. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano (%) obtidos em hemócitos das larvas de *D. melanogaster* e *Z. indianus* tratados com água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida. Linhas verticais indicam valores médios de desvio padrão.

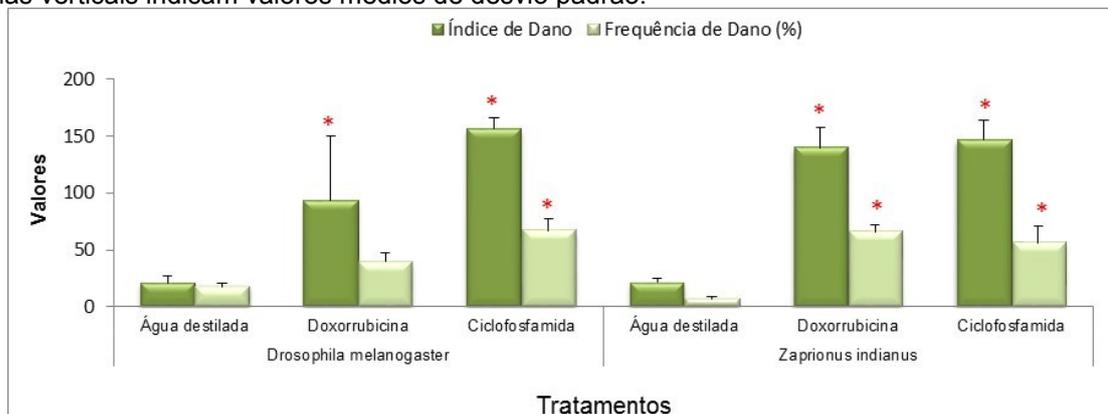
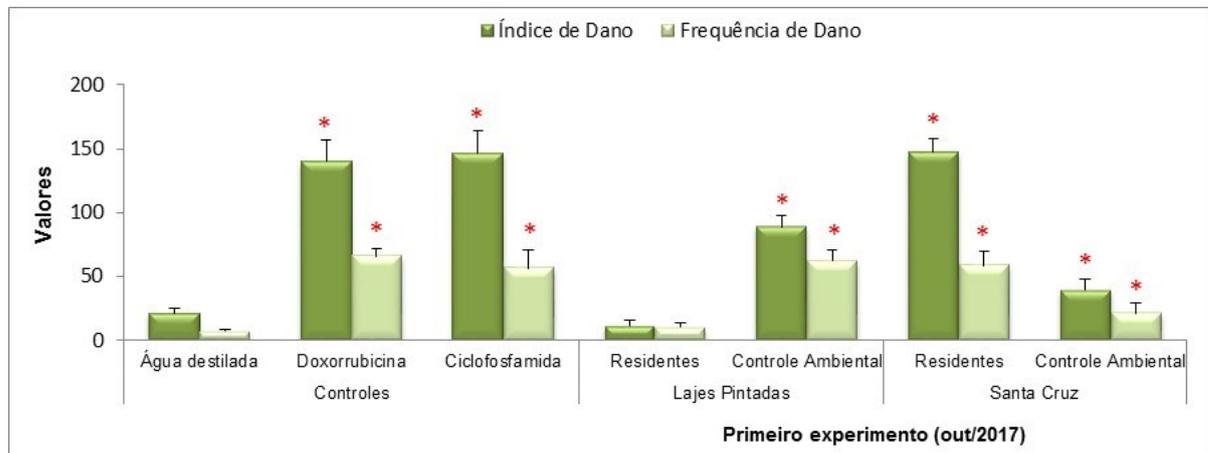


Tabela 3. Primeiro experimento de avaliação do dano genético em hemócitos de *Zaprionus Indianus* após exposição dos organismos em laboratório (água destilada, doxorrubicina e ciclofosfamida) e em campo, nas cidades de Lajes Pintadas (LP) e Santa Cruz (SC) em três réplicas (a, b, c).

Tratamentos	Nível de dano genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
<i>Água destilada</i> ^a	92,00	1,00	2,00	2,00	2,00	19,00	6,07
<i>Água destilada</i> ^b	94,00	0	1,00	2,00	3,00	20,00	6,00
<i>Água destilada</i> ^c	91,00	1,00	3,00	2,00	3,00	25,00	9,00
Média	92,33	0,67	2,00	2,00	2,67	21,33	7,02
SD	1,53	0,58	1,00	0	0,58	3,21	1,71
<i>Doxorrubicina</i> ^a	28,00	16,00	33,00	21,00	2,00	153,00	72,00
<i>Doxorrubicina</i> ^b	34,00	24,00	30,00	12,00	0	120,00	66,00
<i>Doxorrubicina</i> ^c	41,00	9,00	23,00	17,00	10,00	146,00	59,00
Média	34,33	16,33	28,67	16,67	4,00	139,67	65,67
SD	6,51	7,51	5,13	4,51	5,292	17,39	6,51
<i>Ciclofosfamida</i> ^a	47,00	12,00	14,00	11,00	16,00	137,00	53,00
<i>Ciclofosfamida</i> ^b	28,00	20,00	26,00	9,00	17,00	167,00	72,00
<i>Ciclofosfamida</i> ^c	56,00	2,00	10,00	14,00	18,00	136,00	44,00
Média	43,67	11,33	16,67	11,33	17,00	146,67	56,33
SD	14,29	9,02	8,33	2,52	1,00	17,62	14,29
Lajes Pintadas							
Residentes LP ^a	87,00	10,00	3,00	0	0	16,00	13,00
Residentes LP ^b	89,00	11,00	0	0	0	11,00	11,00
Residentes LP ^c	94,00	6,00	0	0	0	6,00	6,00
Média	90,00	9,00	1,00	0	0	11,00	10,00
SD	3,61	2,65	1,73	0	0	5,00	3,61
Controle Ambiental em LP ^a	28,00	50,00	17,00	5,00	0	99,00	72,00
Controle Ambiental em LP ^b	45,00	36,00	13,00	6,00	0	80,00	55,00
Controle Ambiental em LP ^c	41,00	40,00	11,00	8,00	0	86,00	59,00
Média	38,00	42,00	13,67	6,33	0	88,33	62,00
SD	8,89	7,21	3,06	1,53	0	9,71	8,89
Santa Cruz							
Residentes SC ^a	39,00	12,00	15,00	20,00	14,00	158,00	61,00
Residentes SC ^b	32,00	23,00	17,00	18,00	9,00	147,00	68,00
Residentes SC ^c	54,00	6,00	5,00	19,00	16,00	137,00	46,00
Média	41,67	13,67	12,33	19,00	13,00	147,33	58,33
SD	11,24	8,62	6,43	1,00	3,61	10,50	11,24
Controle Ambiental em SC ^a	86,00	3,00	5,00	6,00	0	31,00	14,00
Controle Ambiental em SC ^b	71,00	17,00	9,00	2,00	2,00	49,00	29,00
Controle Ambiental em SC ^c	79,00	11,00	5,00	4,00	1,00	37,00	21,00
Média	78,67	10,33	6,33	4,00	1,00	39,00	21,33
SD	7,51	7,02	2,31	2,00	1,00	9,17	7,51

SD, Desvio padrão.

Figura 4. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano obtidos nos hemócitos das larvas de *Z. indianus* após os tratamentos em laboratório com água destilada, doxorrubicina e ciclofosfamida, e exposição nas cidades de Lajes Pintadas e Santa Cruz, em outubro de 2017.



Asteriscos vermelhos (*) indicam valores significativamente diferentes do grupo controle negativo, tratado com água destilada.

Tabela 4. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nos diferentes tratamentos feitos com *Z. indianus* em outubro de 2017.

Tratamentos	Água destilada	Doxor-rubicina	Ciclo-fosfamida	Residentes LP	Controle Ambiental em LP	Residentes SC	Controle Ambiental em SC
Água destilada		0,001*	0,001*	1,000	0,001*	0,001*	1,000
Doxorrubicina	0,002*		1,000	0,001*	1,000	1,000	0,001*
Ciclofosfamida	0,001*	1,000		0,001*	1,000	1,000	0,004*
Residentes LP	1,000	0,001*	0,001*		0,001*	0,001*	1,000
Controle Ambiental em LP	0,001*	0,002*	0,001*	0,001*		1,000	0,001*
Residentes SC	0,001*	1,000	1,000	0,001*	0,001*		0,003*
Controle Ambiental em SC	1,000	0,001*	0,001*	0,125	0,001*	0,001*	

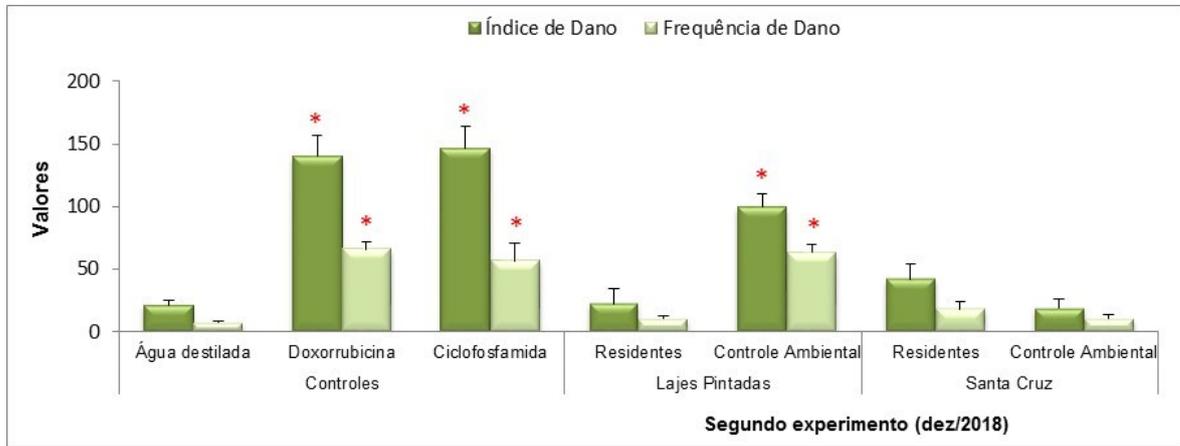
* Indica valores diferentes estatisticamente do controle negativo (água destilada), $P \leq 0,05$.

Tabela 5. Segundo experimento de avaliação do dano genético em hemócitos de *Zaprionus Indianus* após exposição dos organismos em laboratório (água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida) e em campo, nas cidades de Lajes Pintadas (LP) e Santa Cruz (SC) em três réplicas (a, b, c).

Tratamentos	Nível de dano genético					ID	FD %
	0	1	2	3	4		
<i>Água destilada</i> ^a	92,00	1,00	2,00	2,00	2,00	19,00	6,07
<i>Água destilada</i> ^b	94,00	0	1,00	2,00	3,00	20,00	6,00
<i>Água destilada</i> ^c	91,00	1,00	3,00	2,00	3,00	25,00	9,00
Média	92,33	0,67	2,00	2,00	2,67	21,33	7,02
SD	1,53	0,58	1,00	0	0,58	3,21	1,71
<i>Doxorrubicina</i> ^a	28,00	16,00	33,00	21,00	2,00	153,00	72,00
<i>Doxorrubicina</i> ^b	34,00	24,00	30,00	12,00	0	120,00	66,00
<i>Doxorrubicina</i> ^c	41,00	9,00	23,00	17,00	10,00	146,00	59,00
Média	34,33	16,33	28,67	16,67	4,00	139,67	65,67
SD	6,51	7,51	5,13	4,51	5,292	17,39	6,51
<i>Ciclofosfamida</i> ^a	47,00	12,00	14,00	11,00	16,00	137,00	53,00
<i>Ciclofosfamida</i> ^b	28,00	20,00	26,00	9,00	17,00	167,00	72,00
<i>Ciclofosfamida</i> ^c	56,00	2,00	10,00	14,00	18,00	136,00	44,00
Média	43,67	11,33	16,67	11,33	17,00	146,67	56,33
SD	14,29	9,02	8,33	2,52	1,00	17,62	14,29
Lajes Pintadas							
Residentes LP ^a	90,00	2,00	1,00	5,00	2,00	27,00	10,00
Residentes LP ^b	93,00	6,00	1,00	0,00	0,00	8,00	7,00
Residentes LP ^c	87,00	2,00	5,00	5,00	1,00	31,00	13,00
Média	90,00	3,33	2,33	3,33	1,00	22,00	10,00
SD	3,00	2,31	2,31	2,89	1,00	12,29	3,00
Controle Ambiental em LP ^a	29,00	51,00	10,00	9,00	1,00	102,00	71,00
Controle Ambiental em LP ^b	40,00	42,00	9,00	9,00	0,00	87,00	60,00
Controle Ambiental em LP ^c	41,00	25,00	22,00	8,00	4,00	109,00	59,00
Média	36,67	39,33	13,67	8,67	1,67	99,33	63,33
SD	6,66	13,20	7,23	0,58	2,08	11,24	6,66
Santa Cruz							
Residentes SC ^a	89,00	0,00	6,00	4,00	1,00	28,00	11,00
Residentes SC ^b	78,00	8,00	7,00	3,00	4,00	47,00	22,00
Residentes SC ^c	79,00	6,00	3,00	9,00	3,00	51,00	21,00
Média	82,00	4,67	5,33	5,33	2,67	42,00	18,00
SD	6,08	4,16	2,08	3,21	1,53	12,29	6,08
Controle Ambiental em SC ^a	90,00	2,00	4,00	3,00	1,00	23,00	10,00
Controle Ambiental em SC ^b	86,00	5,00	9,00	0,00	0,00	23,00	14,00
Controle Ambiental em SC ^c	94,00	3,00	3,00	0,00	0,00	9,00	6,00
Média	90,00	3,33	5,33	1,00	0,33	18,33	10,00
SD	4,00	1,53	3,21	1,73	0,58	8,08	4,00

SD, Desvio padrão.

Figura 5. Valores médios de Índice de Dano e Frequência de Dano obtidos nos hemócitos das larvas de *Z. indianus* após os tratamentos em laboratório com água destilada, doxorrubicina e ciclofosfamida, e exposição nas cidades de Lajes Pintadas e Santa Cruz, em dezembro de 2018.



Asteriscos vermelhos (*) indicam valores significativamente diferentes do grupo controle negativo, tratado com água destilada.

Tabela 6. Análise do pós-teste de Bonferroni, par a par, dos valores médios obtidos para Índice de Dano (abaixo da diagonal, em cinza) e da Frequência de Dano (acima da diagonal) nos diferentes tratamentos feitos com *Z. indianus* em dezembro de 2018.

Tratamentos	Água destilada	Doxor-rubicina	Ciclo-fosfamida	Residentes LP	Controle Ambiental em LP	Residentes SC	Controle Ambiental em SC
Água destilada		0,001*	0,001*	1,000	0,001*	1,000	1,000
Doxorrubicina	0,002*		1,000	0,001*	1,000	0,001*	0,001*
Ciclofosfamida	0,001*	1,000		0,001*	1,000	0,001*	0,001*
Residentes LP	1,000	0,001*	0,001*		0,001*	1,000	1,000
Controle Ambiental em LP	0,001*	0,033*	0,009*	0,001*		0,001*	0,001*
Residentes SC	1,000	0,001*	0,001*	1,000	0,001*		1,000
Controle Ambiental em SC	1,000	0,001*	0,001*	1,000	0,001*	0,792	

* Indica valores diferentes estatisticamente do controle negativo (água destilada), $P \leq 0,05$.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e Pró-Reitoria para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPESQ) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Aos colegas do Laboratório de Genética, pelo apoio e suporte técnico em diversas etapas deste estudo.

Referências

- ARTHUR V, MA, MASTRANGELO T. **Ionizing Radiations in Entomology**. pp. 213-234. In: *Evolution of Ionizing Radiation Research*, Mitsuru Neno (ed.) InTech, 340 p. 2015.
- AZQUETA A, COLLINS AR. The essential comet Assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol**. v. 87, p. 949-968, 2013.
- BEAM, C.A., MORTIMER, R.K., WOLFE, R.G., et al., The relation of radioresistance to budding in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 49(1) p. 110-122. 1954.
- BETLEM P, BOVENS P, DINGS T, VRIEND S, 2012. **Radioresistance: A search for carotenoids in *Rubro bacter radiotolerans***, Radboud Honours Academy FNWI-Radboud University Nijmegen, IN.DEI.NOMINE.FELICITER. pp. 1-51
- CASTRO, I.F.A. **Avaliação da atividade genotóxica da radiação natural presente na cidade de Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco. 2016.
- CASTRO, I.F.A., VERÇOSA, C.J., COUTINHO-SILVA, R.D., et al., Richness of drosophilids in a naturally radioactive place in the Caatinga biome, Northeast Brazil. **Dros. Inform. Serv.**, v. 98, p. 80-83, 2015.
- COLLINS A., KOPPEN G., VALDIGLESIAS V., DUSINSKA M., KRUSZEWSKI M., MØLLER P., et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutat. Res.** 759, 27-39, 2014.
- CORDEIRO AR, MARQUES EK, VEIGA-NETO J. Radioresistance of a natural population of *Drosophila willistoni* living in a radioactive environment. **Mutat. Res.**, 19, 325-329, 1973.
- GAIVÃO I., SIERRA L.M. *Drosophila* Comet Assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 1-8. 2014.
- GRIGORKINA, E.B. Natural radioresistance as a criterion of species (as exemplified by large taxa of the order Rodentia). **Doklady Biological Sciences**, v. 385, p. 371-373, 2002.
- HALL EJ, GIACCIA E. **Radiobiology for the Radiologist**. 6th edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 2006.
- KOPPEN G, TONCELLI LM, TRIEST L, VERSCHAEVE L. The comet assay: A tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 110, p. 13-24, 1999.

- MATTIMORE, V., BATTISTA, J.R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **J. Bacteriology**, v. 178, n.3, p. 633-637.1996.
- NIKJOO H, UEHARA S, WILSON WE, HOSHI GOODHEAD DT, 1998. Track structure in radiation biology: theory and applications. **International Journal of Radiation Biology** 73(4), 355-364.
- RAMACHANDRAN T.V. Background radiation, people and the environment. **International Journal Radiation Research** 9, 63-76, 2011
- ROHDE, C. 2012. **Desenvolvimentos dos Insetos: Drosophila**. In: GARCIA, S.M.L; GARCIA FERNANDEZ, C. (Org.). Embriologia. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, v. 1, p.335-355.
- SANTOS, J.F.; RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; et al., Colonization of Northeast Region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruit culture. **Dros. Inform. Serv.**, v. 86, p. 92-95. 2003.
- SHCHERBOVA, E.N. **Luchevoe porazhenie (Radiation Damage)**, Moscow: Mosk. Gos. Univ., pp. 138–148, 1987.
- SINGH, NP, McCoy, MT, Tice, RR, Schneider, EL. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. 1988; 175:184-191.
- TICE, RR et al., Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**. 2000; 35:206-221.
- TIDON, R, SENE, FM. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**, v. 6, p. 89-92, 1988.
- UNSCEAR (United Nations Scientific Committee). **Effects of Atomic Radiation Exposures from natural radiation sources**, 1-74, 2000.
- VAISNAV M, XING C, KU HC, HWANG D, STOJADINOVIC S, PERTSEMLIDIS A, et al., Genome-wide Association Analysis of Radiation Resistance in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One** v. 9, n. 8, p. e104858, 2014.
- VERÇOSA, CJ, CASTRO, IFA, GARCIA, ACL, ROHDE, C. An efficient rearing population cage to expose Drosophilids to various environmental agents. **Dros. Inform. Serv.** v. 98, p. 144-145, 2015;
- VERÇOSA, C.J., MORAES FILHO, A.V., CASTRO, I.F.A., SANTOS, R.G., CUNHA, K.S., SILVA, D.M., GRACIA, A.C.L., NAVONI, J.A., AMARAL, V.S., ROHDE, C. Validation of comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 141, p. 148-153, 2017.
- VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical Region? **Dros. Inform. Serv.**, v. 82, p.37-39. 1999. 1970.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que é possível utilizar a espécie *Zaprionus indianus* em experimentos do Ensaio cometa, já que não houve diferenças significativas entre resultados desta espécie com a espécie modelo *Drosophila melanogaster*, nos três tratamentos aplicados (água destilada, doxorubicina e ciclofosfamida).

Também foi observado que os indivíduos *Z. indianus* residentes de Lajes Pintadas/RN, local com elevado índice de radiação natural, não sofreram danos significativos em seu material genético, após exposição à radiação desse ambiente, diferente do observado no grupo controle negativo ambiental, coletado no Parque Nacional do Catimbau, em Pernambuco. Estes resultados demonstram que os indivíduos residentes de Lajes Pintadas estão adaptados e são radiorresistentes. Essa conclusão se apoia também no fato de que indivíduos do grupo controle ambiental sofreram danos genéticos significativos, que foram superiores ao grupo que recebeu tratamento com água destilada. Além disso, esse grupo controle ambiental não apresentou diferenças na comparação com os grupos controles positivos, tratados com ciclofosfamida e com doxorubicina, revelando grande efeito genotóxico da radiação natural de Lajes Pintadas.

Por fim, os resultados da exposição de *Z. indianus* em Santa Cruz/RN, feito em 2018, revelaram que não houve efeitos genotóxicos nos grupos tratados, tanto nos indivíduos residentes em Santa Cruz quanto nos indivíduos do grupo controle ambiental. Entretanto, no experimento realizado em 2017, houve sim elevado nível e genotoxicidade nos residentes de Santa Cruz. Esse resultado discrepante sugere a ocorrência de algum efeito genético intrínseco da linhagem residente estudada. Como ainda há o cultivo desta linhagem em laboratório, desde sua coleta e testes em campo, pretendemos realizar um novo Ensaio cometa com os indivíduos, em condições laboratoriais, e verificar se há alguma instabilidade genômica que justifique os resultados observados no primeiro experimento realizado em Santa Cruz.

Esse trabalho abre novas perspectivas para o estudo da radiorresistência em *Z. indianus* e para o esclarecimento dos mecanismos evolutivos que conferiram essa adaptação a esta espécie invasora do Brasil.

REFERÊNCIAS

- AIEA - Agência Internacional de Energia Atômica. **Nuclear Power Reactors in the World - Reference Data No. 2**. Viena: International Atomic Energy Agency. 2010.
- ARTHUR V.M.A.; MASTRANGELO, T.; **Ionizing Radiations in Entomology**. p. 213-234. In: *Evolution of Ionizing Radiation Research*, Mitsuru Neno (ed.) InTech, 340 p. 2015.
- AZQUETA, A.; COLLINS, A.R. The essential comet Assay: A comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Arch Toxicol.**, Berlin, v. 87, p. 949-968, 2013.
- BÄCHLI, G. 2015. **TaxoDros: The database on taxonomy of Drosophilidae**. Zurique, 2018. Access in 15/06/2013. Disponível em: <http://taxodros.unizh.ch/>.
- BARILLET, S.; ADAM-GUILLERMIN, C.; PALLUEL, O.; PORSHER, J.M.; DEVAUX, A. Uranium bioaccumulation and biological disorders induced in zebrafish (*Danio rerio*) after a depleted uranium waterborne exposure. **Environmental Pollution**, Amsterdam, Elsevier Ltd. v. 159, p. 495-502. 2011.
- BEAM, C.A.; MORTIMER, R.K.; WOLFE, R.G.; et al., The relation of radioresistance to budding in *Saccharomyces cerevisiae*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, Amsterdam, Elsevier LTd. v. 49(1) p. 110-122, 1954.
- BETLEM, P.; BOVENS, P.; DINGS, T.; VRIEND, S. **Radioresistance: A search for carotenoids in *Rubro bacter radiotolerans***, Radboud Honours Academy FNWI-Radboud University Nijmegen, IN. DEI. NOMINE. FELICITER. 2002 p. 1-51
- CAMPOS, T. F. C.; PETTA, R. A.; PASTURA, V. O Radônio 222 ('Radônio Habitacional') e Radiação Natural em Terrenos Pegmatíticos: o caso do município Lages Pintadas (RN, Brasil). In: CONGRESSO IBÉRICO DE GEOQUÍMICA, 8., 2011, Castelo Branco, **Atas [...]** Castelo Branco: Serviços Gráficos do Instituto Politécnico de Castelo Branco, 2011. v. 2, p. 463-467.
- CASTRO, F.L.; VALENTE, V.L.S.; *Zaprionus indianus* is invading Drosophilid communities in the southern Brazilian city of Porto Alegre. **Dros. Inform. Serv.**, Oklahoma, v. 84, p. 15-17. 2001.
- CASTRO, I.F.A. **Avaliação da atividade genotóxica da radiação natural presente na cidade de Lajes Pintadas, Rio Grande do Norte, em *Drosophila melanogaster***. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular Aplicada), Universidade de Pernambuco, Recife, 2016.
- CASTRO, I.F.A.; VERÇOSA, C.J.; COUTINHO-SILVA, R.D.; et al., Richness of drosophilids in a naturally radioactive place in the Caatinga biome, Northeast Brazil. **Dros. Inform. Serv.** Oklahoma, v. 98, p. 80-83, 2015.
- CHAUDHRY, M.A. Biomarkers for human radiation exposure. **J Biomed Sci**, Taiwan, v.15, p. 557-563, 2008.
- CHAVES, L. C. C.; NAVONI, J. A.; FERREIRA, D. M.; MEDEIROS, S. B.; COSTA, T. F.; PETTA, R. A.; AMARAL, V. S. Water mutagenic potential assessment on a semiarid aquatic ecosystem under influence of heavy metals and natural radioactivity using micronuclei test. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 23, n. 8, p. 7572-7581, 2016.

- COLLINS, A.; KOPPEN G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; et al., The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: the ComNet project. **Mutat. Res.** Amsterdam, v. 759, p. 27-39, 2014.
- CORDEIRO, A.R.; MARQUES, E.K.; VEIGA-NETO, J. Radioresistance of a natural population of *Drosophila willistoni* living in a radioactive environment. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 19, p. 325-329, 1973.
- DANTAS, R.C.; NAVONI, A.J.; FERREIRA, M.D.; COSTA, T.F.; MEDEIROS, S.R.B.; AMARAL, V.S. Influence of natural radon and metal contamination on surface water quality from a Brazilian Semiarid Region. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 39, p. 275-282. 2017
- DANTAS, S.R.C.; ALVES, N.O.; FERREIRA, D.M.; CAMPOS, T.F.C.; PETTA, R.A.; MEDEIROS, G.F.F.; AMARAL, V.S. Uso da Ecotoxicologia na investigação da toxicidade associada à radiação natural no açude Riacho da Cachoeira, região do Semiárido/Brasil. **Revista de Geologia**, Fortaleza, V. 26, n. 2, p.109-119. 2013
- GAIVÃO I.; SIERRA, L.M. *Drosophila* Comet Assay: insights, uses, and future perspectives. **Frontiers in Genetics**, Lausanne, v. 5, p. 1-8. 2014.
- GRAF, U.; WURGLER, F.E.; KATZ, A.J.; et al., Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environ. Mutag.**, Bethesda MD, v. 6, p.153-188. 1984.
- GRIGORKINA, E.B. Natural radioresistance as a criterion of species (as exemplified by large taxa of the order Rodentia). **Doklady Biological Sciences**, Russian, v. 385, p. 371-373, 2002.
- HAFER, K.; IWAMOTO, K.K.; SCURIC, Z.; SCHIESTL, R.H. Adaptive response to gamma radiation in mammalian cells proficient and deficient in components of nucleotide excision repair. **Radiation Research.**, Oxford, v. 2, p. 168-174, 2007.
- HALL, E.J.; GIACCIA, E. **Radiobiology for the Radiologist**. 6th edition. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 2006.
- HOWELL, L.; SAMPSON, C.J.; XAVIER, M.J.; BOLUKBASI, E.; HECK, M.M.; WILLIAMS, M.J. A directed miniscreen for genes involved in the *Drosophila* anti-parasitoid immune response. *Immunogenetics*, Berlin, v. 64(2), p. 155--161,2012.
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2014. **Censo Demográfico**. Disponível em: <http://cidades.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 dez. 2014.
- INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2010: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro. 2010.
- JHA, A.N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, Swansea-UK, v. 23, n.3, p. 207-221, 2008.
- KOPPEN, G.; TONCELL, I. L.M.; TRIEST, L.; VERSCHAEVE, L. The comet assay: A tool to study alteration of DNA integrity in developing plant leaves. **Mech. Ageing. Dev.** Amsterdam, v. 110, p. 13-24, 1999.
- MARCON, A.E.; FERREIRA, D.D.; MOURA, M.D.V.; et al., Genotoxic analysis in aquatic environment under influence of cyanobacteria, metal and radioactivity. **Chemosphere**, Amsterdam, v. 81, p. 773-780, 2010.
- MATTIMORE, V.; BATTISTA, J.R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. **J. Bacteriology**, Washington, v. 178, n.3, p. 633-637,1996.

METTLER JUNIOR, F.A.; VOELZ, G.L. Major radiation exposure what to expect and how to respond. **New England J. Medicine**, New England, v. 346, p.1554-1561, 2002.

MOSQUERA, B.; VEIGA, R.; ESTELLITA, L.; et al., ¹³⁷Cs distribution in guaba trees. **Braz. J. Phys.**, Niteroi, Rio de Janeiro, v. 34, p. 841-844. 2004.

NIKJOO, H.; UEHARA, S.; WILSON, W.E.; HOSHI GOODHEAD, D.T. 1998. Track structure in radiation biology: theory and applications. **International Journal of Radiation Biology**, United kingdom. v. 73, n.4, p. 355-364,1998.

ÖSTLING, O.; JOHANSON, K.J.; Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. Amsterdam. v.123, p.291-298. 1984.

POWELL, J.R. Progress and prospects in Evolutionary Biology: The Drosophila model. Oxford, UK : Oxford University Press, 1997.

RAMACHANDRAN, T.V.; Background radiation, people and the environment. **Internation Journal Radiation Research**. Tehra, v. 9, p.63-76. 2011.

ROHDE, C. 2012. **Desenvolvimentos dos Insetos: Drosophila**. In: GARCIA, S.M.L; GARCIA FERNANDEZ, C. (Org.). Embriologia. 3 ed. Porto Alegre: ARTMED, v. 1, p.335-355.

ROHDE, C., D.M.I.O. Silva, J.C.L.A. JUCÁ, M.A. MONTES, A.C.L. GARCIA. Espécies invasoras da família drosophilidae (Diptera/Insecta) em ambientes da Caatinga de Pernambuco. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 7, p.227-240, 2010.

SAMET, J.M. Radiation and cancer risk: a continuing challenge for epidemiologists. **Environ. Health**, Cairo, v. 10 (Suppl 1), p. S4, 2011.

SANTANA S.L. **O Ensaio Cometa em *Drosophila melanogaster* como bioindicador da poluição atmosférica em uma área urbana e rural**. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2015.

SANTANA, S.L.; et al., *Drosophila melanogaster* as model organism for monitoring and analyzing genotoxicity associated with city air pollution. **Environmental Science and Pollution Research**, New York, v. 25, n. 32, p. 32409–32417, 2018.

SANTOS, J.F.; RIEGER, T.T.; CAMPOS, S.R.C.; et al., Colonization of Northeast Region of Brazil by the drosophilid flies *Drosophila malerkotliana* and *Zaprionus indianus*, a new potential insect pest for Brazilian fruit culture. **Dros. Inform. Serv.** Oklahoma. v. 86, p. 92-95. 2003.

SCORZA, E.P. **Província Pegmatítica da Borborema (Nordeste do Brasil)**. MA, DNPM, DGM. Rio de Janeiro. (Boletim 112), p. 1-58.1994.

SHCHERBOVA, E.N. **Luचेvоe porazhenie (Radiation Damage)**, Moscow: Mosk. Gos. Univ., pp. 138–148, 1987.

SINGH, N.P.; McCoy, M.T.; Tice, R.R.; Schneider, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**. Amsterdam. v.175, p.184191,1988.

TAYLOR, S.; MCINTOSH, A.; WALKER, T. The collapse of 'geologic time. **Creation.**, v. 4, p. 30-3, 2001.

TICE, R.R.; *et al.*, Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in Vitro and in Vivo Genetic Toxicology Testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New Jersey, v.35, p. 206-221, 2000.

TIDON, R.; SENE, F.M. A trap that retains and keeps *Drosophila* alive. **Drosophila Information Service**, Oklahoma, v. 6, p. 89-92, 1988.

UNSCEAR (United Nations Scientific Committee). **Effects of Atomic Radiation Exposures from natural radiation sources**, Nações unidas. p.1-74, 2000.

VAISNAV, M.; XING, C.; KU, H.C. HWANG D, STOJADINOVIC S, PERTSEMLIDIS A, *et al.*, Genome-wide Association Analysis of Radiation Resistance in *Drosophila melanogaster*. **PLoS One**. California.v. 9, n.8, p. 104858. 2014.

VERÇOSA, C.J.; MORAES FILHO, A.V.; CASTRO, I.F.A.; SANTOS, R.G.; CUNHA, K.S.; SILVA, D.M.; GRACIA, A.C.L.; NAVONI, J.A.; AMARAL, V.S.; ROHDE, C. Validation of comet assay in Oregon-R and Wild type strains of *Drosophila melanogaster* exposed to a natural radioactive environment in Brazilian semiarid region. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 141, p. 148-153. 2017.

VERÇOSA, C.J.; CASTRO, I.F.A.; GARCIA, A.C.L.; ROHDE, C. An efficient rearing population cage to expose Drosophilids to various environmental agents. **Dros. Inform. Serv.** Oklahoma, v. 98, p. 144-145, 2015.

VILELA, C.R. Is *Zaprionus indianus* Gupta, (Diptera, Drosophilidae) currently colonizing the Neotropical Region? **Dros. Inform. Serv.** Oklahoma, v. 82, p.37-39, 1999. 1970.

WILSON, J.; YOUNG, A.; CIVITELLO, E.R.; *et al.*, Analysis of heat-labile sites generated by reactions of depleted uranium and ascorbate in plasmid DNA. **J. Biol. Inorg. Chem.**, New York, v. 19, p. 45-5, 2014.